

## **A dentin caries in vitro modellezése és a de- és remineralizációját befolyásoló tényezők vizsgálata**

A vizsgálathoz orthodontiai célból eltávolított alsó és felső kisőrlő fogakat gyűjtöttünk, melyeket a feldolgozás kezdetéig 0,2%-os nátrium-azid oldatban, hűtőszekrényben, +4°C-on tároltunk. Vizsgálatainkat a Shellis-féle modellnek megfelelő kísérleti rendszeren többcsatornás pumpával (ISM 934 Ismatec SA Corp. Glattburg-Zurich, Switzerland) végeztük. A kísérleti rendszer lehetővé tette, hogy több minta tartozzon mind a kontroll mind a teszt csoportba. A fogak koronájának bukkális felszínén, lassú fordulattal, vízhűtéssel, fissura fúróval 1mm átmérőjű, a zománc-dentin vastagság felének megfelelő mélységig preparáltunk a dentinbe. Ezt a röntgen kép után korrigáltuk úgy, hogy a cavitas alja és a pulpakamra közötti távolság 1mm legyen, mert a kapilláris hossza fordított arányban áll a rajta áthaladó folyadék térfogatával. Ezzel a minták homogenitását fokoztuk. A fogkorona occlusalis felszínén keresztül a pulpakamrába, valamint az apikális forámenen keresztül a gyökércsatornába injekciós tűt (G16-os) vezettünk és Araldittal hermetikusan rögzítettük. A kialakított kavitas kivételével a fog teljes felszínét két rétegű lakkal vontuk be. A pulpa üregrendszer teljes megtisztítása érdekében 2 mol NaOH oldattal 20 secundumig átmostuk azt. Ezt követően meghatároztuk a minták hidraulikus konduktancia ( $L_p$ ) értékeit direkt módszerrel, oly módon, hogy a pulpai oldalról a légköri nyomást 30 vízcmm-rel ( $P$ ) meghaladó nyomással áramoltattunk desztillált vizet (1. ábra). A cavitas külső felszínéről 1000 másodperc ( $t$ ) alatt elvezetett folyadék mennyiségét mértük ( $\Delta V$ ). A diffúziós felszín ( $A=0,7854 \text{ mm}^2$ ) volt. A Poussille-Hagen, valamin a Fick II. törvényéből egyszerűen meghatározható a hidraulikus konduktancia ( $L_p$ ) érték. Ez az érték jellemző a mintára és nagyon érzékenyen jelzi a kapillárisok átmérőjében végbemenő változásokat (a kapilláris

sugarának 4. hatványával arányosan). Ez alapján a hidraulikus konduktancia érték egyszerűen kiszámítható:

$$L_p = \frac{\Delta V}{\Delta t \cdot \Delta P}$$

Az átlagos  $L_p$  érték  $7,52 \pm 0,62 \times 10^{-8}$  m/s kPa volt.

A fogakon preparált kavitásban mesterséges karieszes léziókat hoztunk létre harminckét napos átáramoltatással (Shellis szerint), a fog külső felszínén demineralizációs oldatot, míg a pulpakamrában dentinfolyadékot áramoltattunk termosztát szekrényben 37°C-on.

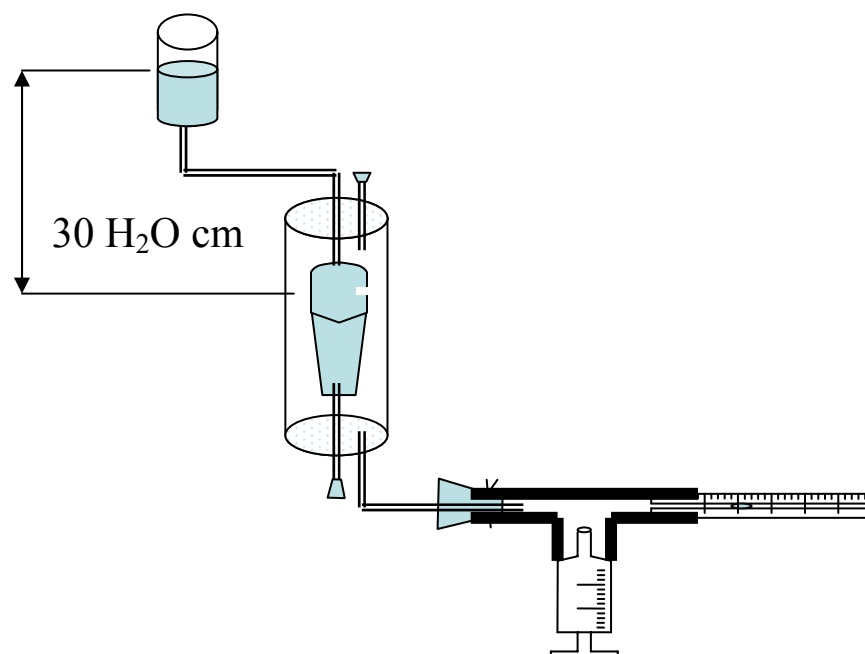
Művi dentin folyadék: 1000 ml-ben 7,149 g HEPES puffer, 1,1 ml 1,0 mol/l  $H_3PO_4$  törzsoldat, 0,052 g CaO, 0,024 g MgO, 4,54 g NaCl, a végső pH-t 7,4 értékre állítottuk.

Demineralizáló puffer: 1000 ml-ben 50 mmol acetát, 1,7 mmol Ca, 1,7 mmol P, melynek pH-ját 5,0 állítottuk be.

Ismételten megmértük a minták  $L_p$  értékeit, melynek eredménye  $44,9 \pm 16,7$  %-os csökkenést eredményezett, mind a kontroll, mind a tesztcsoportban. A mintákat TBS (TRIS Buffered Saline) pH 7,2 oldatban tároltuk a kísérlet folytatásáig.

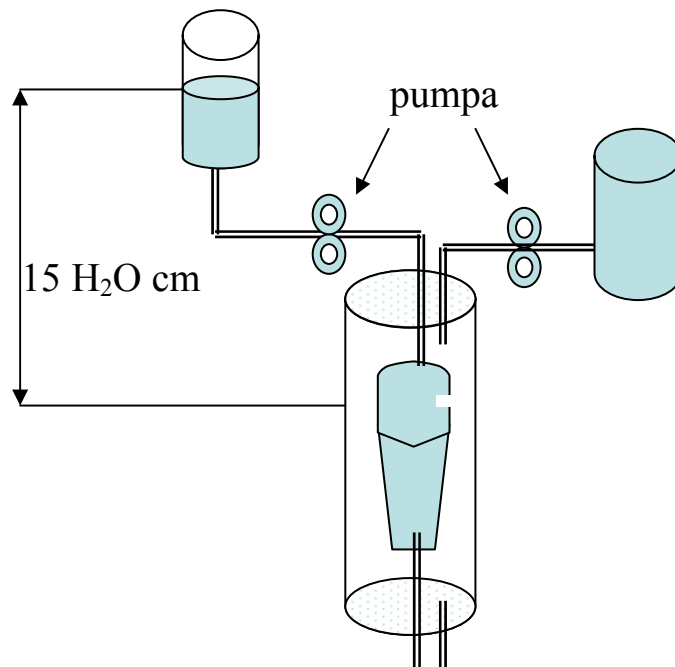
Elkészítettük a remineralizációs oldatot Arends szerint, mely a kontroll csoport (A) esetében a következő összetételű volt: 15mM Ca, 0,9 mM foszfát, 20 mM HEPES, pH 7,0 értékre beállítva. Az alacsony fluorid tartalmú (B) tesztcsoportban ehhez az oldathoz még 2 ppm fluoridot adtunk NaF só formájában. A magas fluorid tartalmú (C) tesztcsoportban 10 ppm fluoridot adtunk a remineralizációs oldathoz. Nyolc napon át a külső kamrában áramoltattuk a csoportoknak megfelelően elkészített remineralizációs folyadékot, párhuzamosan a pulpa felől, 15 vízcm nyomással áramoltatott dentinfolyadékkal (2. ábra).





**1. ábra**

**Az  $L_p$  érték meghatározására szolgáló rendszer**



**2. ábra**

**A minták perfúziójára szolgáló rendszer**

**A hidraulikus konduktancia ( $L_p$ ) mérések:**

A minták  $L_p$  értékeinek ismételt mérése a kontroll csoportban további  $14,1 \pm 8,7\%$ -os, míg a B teszt csoportban további  $18,7 \pm 9,2\%$ -os, a C csoportban pedig  $41,55 \pm 16,62\%$ -os csökkenést eredményezett. Az A és B csoportok között nem találtunk statisztikai próbával szignifikáns különbséget, de a C csoport mindkét másik csoporttal szemben szignifikánsan nagyobb csökkenést mutatott ( $p < 0,05$ ).

A SEM és a röntgen spektroszkópos vizsgálatok megkezdéséig feldolgozásra váró mintákat TBS (TRIS Buffered Saline) pH 7,2 oldatban tároltuk a feldolgozásig. A mintákat ezt

követően a fog hosszanti tengelyében korongvágóval meggyengítettük és kettétörtük úgy, hogy a törésvonal a korábban mesterségesen létrehozott karieszes üregen keresztül haladjon. Így minden mintából nyertünk egy részletet SEM feldolgozásra és egy darabot röntgen spektroszkópiai vizsgálatra. Ezen vizsgálatokra a mintákat előkészítettük és egyedi jelöléssel ellátva tároltuk a vizsgálatok kezdetéig.

### **Scanning elektronmikroszkópos vizsgálat:**

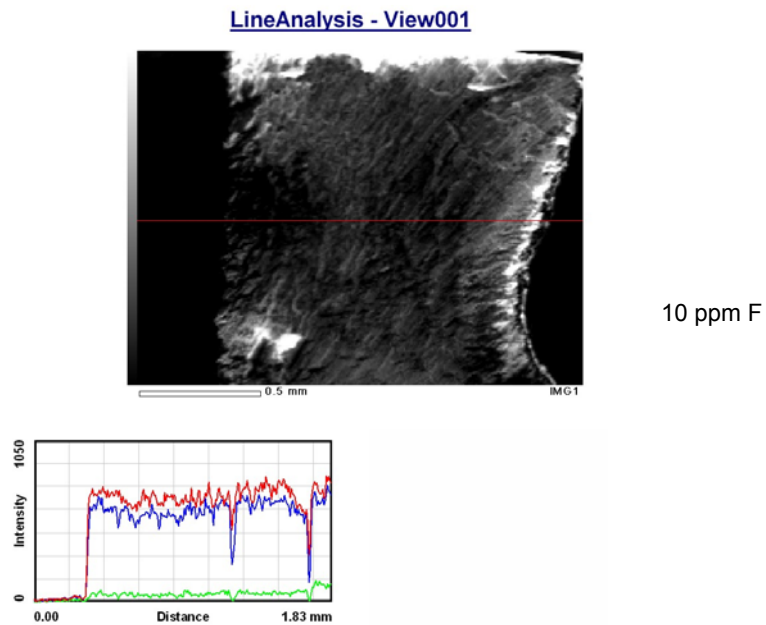
A 32 napig tartó művi dentinfolyadékkal és demineralizációs oldattal történő átáramoltatás után a scanning elektromikroszkópos képen a dentintubulusokban brushit és withlockit kristályokat figyeltünk meg. Ezen kristályok jelenléte magyarázza a mért Lp érték csökkenést. A művi carieszes dentin külső felszínéhez közel, 30-40  $\mu\text{m}$  vastagságban a dentin tubulusok kitágultak, megfigyeltük a peritubuláris dentinréteg enyhe elvékonyodását és az intertubuláris dentin demineralizációját, azaz a kollagénrostok szabaddá válását. A remineralizációs oldattal való 8 napon át történő kezelés a kontroll csoportban teljesen egyenetlen változásokat eredményezett. Voltak olyan fokális területek, ahol hipermineralizáció alakult ki 300  $\mu\text{m}$  mélységben a felszíntől kiindulva. Azonban más területein a cavitásnak felszíni remineralizáció volt megfigyelhető. A cavitás újabb területein pedig semmiféle remineralizáció nem volt látható. Az alacsony fluorid koncentrációjú remineralizációs oldattal kezelt (B csoport) minták egyenletes felszíni 30  $\mu\text{m}$  remineralizációt mutattak. Alatta viszont az ép dentin és a felszíni remineralizációs zóna között demineralizált zóna volt megfigyelhető. A magas koncentrációban jelenlévő fluorid tartalmú remineralizációs oldattal kezelt (C csoport) minták esetében vastagabb felszíni remineralizált zónát (100  $\mu\text{m}$ ) figyeltünk meg.

### **Röntgen spektroszkópia vizsgálat:**

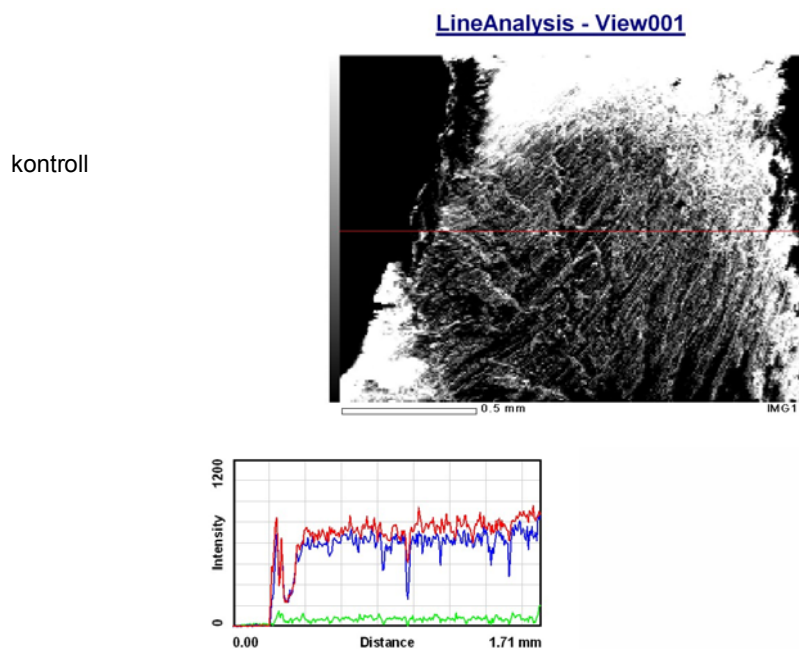
A Ca, P és F elemek denzitását a cavitas alján a pulpakamráig terjedően 3 ponton mértük. A vonal analízis az A mintában nagyon változó remineralizációs területeket mutatott. Voltak hipermineralizált foltok, és hipomineralizált területek is. A fluoridot alacsony koncentrációban tartalmazó csoportban (B csoport) egy homogén felszíni remineralizációs réteget figyeltünk meg. A fluoridot nagy koncentrációban tartalmazó (C csoport) hasonlóan homogén, de vastagabb remineralizációs réteget mutatott (1. táblázat). A kétféle koncentrációban fluoridot tartalmazó remineralizált minta réteg vastagsága között szignifikáns eltérést találtunk ( $p < 0,01$ ) (1. táblázat). A magas koncentrációjú F-ot tartalmazó csoportban, a remineralizált rétegben az összes általunk vizsgált elem (úgy mint a fluorid, a kalcium és a foszfor) fokozott jelenlétét figyeltük meg, amely értékek szignifikánsnak mutatkoztak ( $p < 0,05$ ) (3., 4., 5. ábra).

**1. táblázat**

<b>Remineralizáló oldat</b>	<b>Remineralizált réteg vastagság (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Nem remineralizált réteg vastagság (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
+ 2 ppm F	0,0294 $\pm$ 0,0102	0,1588 $\pm$ 0,0216
+ 10 ppm F	0,1143 $\pm$ 0,0118	0,0214 $\pm$ 0,0121



**3. ábra: A 10 ppm fluorid tartalmú remineralizáló oldattal kezelt minta röntgenspektroszkóp elemzése (piros: Ca, kék: P, zöld: F)**

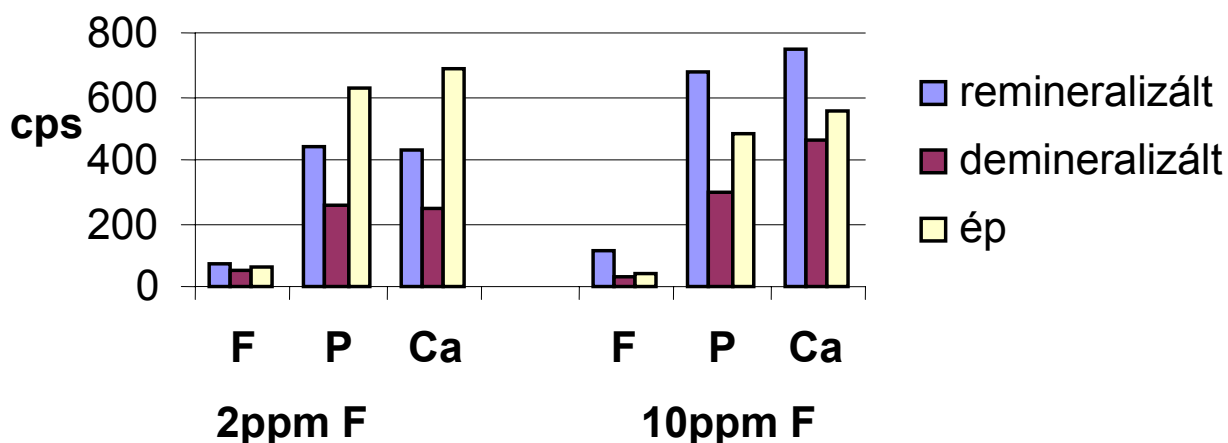


**4. ábra: A kizárólag remineralizáló oldattal kezelt minta röntgenspektroszkóp elemzése (piros: Ca, kék: P, zöld: F)**



5. ábra

### Elemek eloszlása a minták különböző rétegeiben



### Transzmissziós radiográfiás (TMR) vizsgálat:

A tervezett TMR vizsgálatot mellőztük, mert idő közben egyik résztvevőnk mikro-komputertomográf készüléket nyert egy pályázat kapcsán. A többszöri szerződésmódosítások és ismételt közbeszerzési eljárás miatt azonban csak egy évvel később, idén márciusban üzemelik be a készüléket. Azokat a térfogat értékeket ( $\Delta Z$ ), amelyeket a TMR vizsgálatnál csak hosszas számításokkal lehet megkapni, a mikroCT-vel (melynek  $5\mu\text{m}^3$  a valós térbeli felbontása) könnyedén meghatározható a készülékhez tartozó szoftver segítségével. A csoportokat reprezentáló mintákat e célból külön tároljuk, és a vizsgálatokat a készülék beüzemelése után elvégezzük..

## Megbeszélés

A Shellis modell alkalmazása intratubuláris változásokat eredményez a művi caries kialakulása során. Ez az intratubuláris folyamat jelentős változást eredményez a dentinfolyadék mozgásában. Ez fordítva is igaz, ugyanis a dentinen keresztül történő folyadék mozgás nagyon érzékeny jellemzője az intratubuláris ásványi anyag kristály formában való kiválásának, azaz a tubulus lumen beszűkülésének. Megfigyelésünk megerősíti a művi carieses lézió esetében az előbbi feltételezést. Az Lp érték különösen érzékenyen mutatja a dentintubulusba lerakódó kristályok jelenlétét, mert a kapillárisokban történő folyadék mozgás a kapilláris sugarának 4. hatványával arányos. A Shellis modell szerint kezelt dentin tubulusaiban lumen-átmérőt szűkítő kristályok csapódtak ki a lokálisan kialakuló túltelített oldatból. Ez teljesen megfelel a Gysi-Furrer szerinti dentincaries transparens dentin rétegének, ahol ún. caries kristályok szűkítik a dentintubulusokat. Ez a réteg valószínűleg ugyanúgy egyszerű fiziko-kémiai hatások eredményeképpen alakul ki, mint a Shellis modellben. A Shellis modell nagy előnye a dentin remineralizációs kísérletekben, hogy homogén mintacsoportok képezhetők. Kiszámú mintán (még emberi fogból származók is) megvalósítható ez a feltétel. Ilyenformán a statisztikai analízis is hamarabb mutatja a jelentős különbségeket.

A dentin remineralizáció fontos lehet a gyakorlati konzerváló fogászatban is. Amennyiben követni kívánjuk a nem invazív elveket, akkor a még ép kollagén rostok remineralizációjával jelentős, akár 0,1-0,2 mm vastag dentin réteget menthetünk meg a cavitas alján. Ezeket a megfigyeléseket Fusayama közölte, aki kidolgozta annak technikáját, hogy hogyan különböztessük meg a még remineralizálható kollagént az erre alkalmatlan, károsodott

szerkezetű kollagéntől. Koncepciónk szerint a zománc remineralizációban eredményesen használt anyagok dentinen való alkalmazása közelebb vihet a megoldáshoz. Kísérleteinkből levonható, hogy az egyenletes remineralizációs réteg kialakulásának előfeltétele a fluorid jelenléte. Ha ez az elem hiányzik, akkor a remineralizáció random módon, foltszerűen megy végbe. A klinikai fogászatnak egy megbízható, a cavitas egész felszínét egyformán érintő remineralizációs módszerre van szüksége. Ezért úgy látjuk, hogy bármilyen remineralizációs oldat is kerüljön klinikai alkalmazásra, annak fluoridot tartalmaznia kell. Azt is megfigyeltük, hogy minél nagyobb a fluorid koncentráció, annál vastagabb rétegben megy végbe a felszíni remineralizáció. Ez azt is eredményezi, hogy a cavitas szenzitivitása megszűnik és nincs utófájdalom a restauráció után. Azonban sajnos a teljes demineralizált dentin vastagságot nem sikerült remineralizálni, amely kedvezőtlen alapot biztosít a tömések terhelésével szemben, melyet a rágóerő hoz létre. Újabb koncepciók és további erőfeszítések szükségesek ahhoz, hogy egy jó statikai alapot biztosító, teljes vastagságában remineralizált cavitas bennéket alakíthassunk ki.